

④ Int. Cl.⁴G 01 N 33/531
C 12 N 15/00

識別記号

庁内整理 号

Z-7908-2G
8412-4B

④ 公開 昭和63年(1988)5月18日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

発明の名称 DNAの分子重量測定用標準マーカー

④ 特 願 昭61-148891

④ 出 願 昭61(1986)6月25日

④ 発 明 者 石 和 浩 美 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社
内④ 発 明 者 柴 原 春 恵 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社
内

④ 出 願 人 株式会社ヤクルト本社 東京都港区東新橋1丁目1番19号

④ 代 理 人 弁理士 尾崎 光三

明 示 書

標準マーカー。

1. 発明の名称

DNAの分子重量測定用標準マーカー

2. 特許請求の範囲

(1) プラスミドpHY300PLEに対して唯一の制限酵素切裂部位を有する制限酵素によって当該pHY300PLEを切裂して得られる1,878bpのDNA断片と、当該pHY300PLEを制限酵素EcoIによって切裂して得られる2,818bp、1,308bp、858bp、488bp、287bp及び88bpの6種類のDNA断片と、当該pHY300PLE由来のプラスミドpHY300.2PLEを制限酵素EcoIによって切裂して得られる1,308、1,107、828、658、488、287及び88bpの7種類のDNA断片とを、混合して成るDNAの分子重量測定用標準マーカー。

(2) プラスミドpHY300PLEに対して唯一の制限酵素切裂部位を有する制限酵素が、EcoIである特許請求の範囲第1項記載DNAの分子重量測定

3. 発明の詳細な説明

<産業上の利用分野>

本発明は、アガロースゲル、ポリアクリルアミドゲル電気泳動等によりDNAの分子量を測定する場合に適用されるDNAの分子重量測定用標準マーカーに関するものであり、更に詳しくは、高分子量領域から低分子量領域に亘る広い分子重量領域にわたって適度に分散分布した数個バンドをゲル上に明確に形成し得るDNAの分子重量測定用標準マーカーに関するものである。

<従来の技術及びその問題点>

従来、アガロースゲル電気泳動、アクリルアミドゲル電気泳動等に代表されるゲル電気泳動により、DNAの分子量を測定する場合にスタンダード(参照用標準)として使用される分子重量測定用標準マーカー(以下、分子重量マーカーという)が、種々、開発されているが、実際には、DNAの分子

用可能な分子重量マーカーは比較的少なく、一般に、低分子重量領域で優れた分散分特性を示す低分子重量マーカーと、高分子重量領域で同様の特性を示す高分子重量マーカー等を、適宜、選択し、利用目的に応じて、各々組み合わせて使用することが一般的な使用方法となっている。

現在、広く普及している分子重量マーカーとして、例えば、 ϕ X174RF を制限酵素 Eco III で切断して作成されたものや、 λ ファージ DNA を制限酵素 Eco III で切断して作成されたもの等があるが、前者は、低分子重量領域において優れた分散分特性を示すが、アガロースゲル電気泳動に用いると、泳動バンドが重なり合っていて分別が不明瞭となる傾向があり、また、後者は、20kb以上の高分子重量領域で有効であるが、低分子重量領域における分子重量マーカーとしては不適当である。

このように、使用する分子重量領域に応じて、使用可能な分子重量マーカーが限られているために、実際に、適当な分子重量マーカーを選択し、各々、

場が多く、更に、ガラス製の試管やプレートを用いる場合からも、より広い分子重量領域にわたって適用可能な広域分子重量マーカーがあれば、その有用価値は大きなものである。その上、従来、多く分子重量マーカーは、その製造工程において高度技術と設備をテフニクが必要とされることから、生産コストが極めて高く、コスト面からも、より経済性の高い製造技術を開発することが強く要請されている状況にあった。

分子重量マーカーについてのこのような問題点を検討すると共に、本発明者らは、より広い分子重量領域において適用可能な優れた分子重量マーカーを開発すべく鋭意研究開発を積み重ねた結果、プラスミド pBT300PLE 及び菌株 pBT300PLE 由来の pBT300.2PLE 等、各々特定の制限酵素により切断して得られる DNA 断片の混合物が、このような分子重量マーカーとして好適であることを見出し、本発明を完成するに至った。

<問題点を解決するための手段>

すなわち、本発明は、アガロースゲル電気泳動等に適用可能で、より広い分子重量領域において使用することのできる DNA の分子重量測定用標準マーカーを提供することを目的とするものである。

そして、このような目的を達成するために採用される本発明の構成は、①プラスミド pBT300PLE に対して唯一の制限酵素切断部位を有する制限酵素によって菌株 pBT300PLE を切断して作成される 6,670bp の DNA 断片と、②菌株 pBT300PLE を制限酵素 Eco III によって切断して作成される 2,010bp、1,300bp、850bp、400bp、207bp 及び 80bp の 6 種類の DNA 断片と、③菌株 pBT300PLE 由来のプラスミド pBT300.2PLE を Eco III によって切断して作成される 1,300、1,107、926、800、400、207 及び 80bp の 7 種類の DNA 断片とを混合して成るものである。

ここで、前記③記載のプラスミド pBT300PLE に対して唯一の制限酵素切断部位を有する制限酵素としては、例えば、 Eco III が好適に使用されう

る。

出発材料として使用するプラスミド pBT300PLE は、公知・入手可能（特許新案第 746 号として通商産業省工業技術院微生物工芸技術研究所に寄託）のものであり、大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来のプラスミド pACYC177 と、ストレプトコッカス・フェカリス (*Streptococcus faecalis*) 由来のプラスミド p104 を組換えて作成された複合プラスミド pBT100 から公知手段により作成される (Jpn. J. Genet. 22, 238-243 (1976) 参照)。

また、前記③記載のプラスミド pBT300.2PLE は、以下の工程により菌株 pBT300PLE から作成される。すなわち、プラスミド pBT300PLE を制限酵素 Eco I 及び Eco IV により切断して得られる 2 種類の DNA 断片のうちの低分子量の断片と、前記複合プラスミド pBT100 由来で公知手段により作成された pBT340 を Eco I 及び Eco IV により切断して得られる 2 種類の DNA 断片のうちの高分子量の断片とを混合して pBT300.2PLE を作成する工程を経て、次いで、菌株 pBT300.2PLE の Eco III 切断部位に、

なお、前記 pHT300.7PLE の作製は、従来、公知の手段により実施される (Jpn. J. Genet. 12, 405-408 (1985) 項)。そして、この pHT300.7PLE は、制限酵素 Eco I による制限部位が、pHT300由来の DNA 断片中 (これを Eco I¹ とする) と、pHT300PLE 由来の DNA 断片中 (これを Eco I² とする) とが併存するが、このうち、 Eco I² 制限部位に、 Eco I リンカーが2個挿入されたものが、pHT300.2PLE (4,007bp) である。

この pHT300.2PLE は、挿入された2個の Eco I リンカーにより、新たに Eco I 制限部位及び Eco I 制限部位が形成されると共に、 Eco I² 制限部位を消失するが、テトラサイクリン耐性遺伝子中の Eco I は残存しているので、前記 pHT300.2PLE による形質転換体は、テトラサイクリン耐性を示す。

pHT300.2PLE の製作工程及び pHT300.2PLE の制限酵素地図を、各々、第2図及び第3図に示す。

本発明の分子重量マーカーの構成要素である pHT300PLE 及び pHT300.2PLE の各制限 A~I と、相対する分子重量との関係を表1に示す。

表 1
(単位: bp)

アライメント 制限部位	pHT300PLE	pHT300PLE	pHT300.2PLE
	Size (bp)	Size (bp)	Size (bp)
A	4,070	—	—
B	—	2,010	—
C	—	1,300	1,300
D	—	—	1,107
E	—	—	920
F	—	650	650
G	—	400	400
H	—	207	207
I	—	00	00

され、これにより得られた DNA 断片を、適宜の割合で混合することにより、目的の分子重量マーカーが製作される。

そして、例えば、前記 A、及び B 位の DNA 断片を、1:2:10の割合で混合して、製した分子重量マーカーを1%アガロースゲル電気泳動により泳動テストした結果 (第4図A、レーン2参照) から確認されるように、本発明の分子重量マーカーは、5000bp の高分子量領域から、80bp の低分子量領域にわたって、適度に分散分布した9本の明確なバンドの形成が可能であるという従来製品にみられない顕著な効果を有することが判明した。

また、DNA 断片作製のための出発材料としての pHT300PLE 及び pHT300.2PLE は、大腸菌 (*E. coli*) によるマルチコピーベクターとして、前記を処理により、きわめて高収率の生産が可能であることから、生産コストの面においてもそのコスト低減効果は絶大である。

<実施例>

以下に、実施例を記載して、更に、本発明について具体的に説明するが、本発明は、いうまでもなく前記実施例の範囲に限定されるものではない。

(1) pHT300.7PLE の Eco I 制限部位の保持及び Eco I リンカーの挿入 (pHT300.2PLE の作製)

53 μ l の pHT300.7PLE DNA (100 μ g / μ l) (J. Genet. 10, 405-408 (1985) 参照) に、5.7 μ l の10倍濃度緩衝液 (1M Tris-HCl (pH 7.8), 70mM $CaCl_2$, 70mM β -メルカプトエタノール, 500mM NaCl) を加えた後、 Eco I (3.5 u / μ l) を2 μ l 添加し、37 $^{\circ}$ C、30分間反応させた。70 $^{\circ}$ Cで5分間加熱することにより反応を停止させた後、1%低融点アガロースゲル (8 \times 12 cm, 1 μ g / μ l エチジウムブロマイド含有) 電気泳動を行い、 Eco I により1ヶ所が制限された分子重量約 3.0 kb のバンドを切り出した。

pH 8.0) を加え、37℃の湯槽中で溶かしした後、室温までさまし、等量のフェノールを加えてよく攪とうした。次に、室温で 15000rpm、3 分間の遠心分離処理を施した後、DNA を含む水層を採取し、再び等量 フェノールを加え、同様の処理を繰返し、DNA を含む水層を採取した。続いて、これに 200 μ l の緩衝液 (50mM Tris, 10mM EDTA, 100mM NaCl (pH 8.0)) を加え、更に全量の 2 倍量の -20℃の冷エタノールを加え、-20℃、20 分間冷却した。これに 0℃、15000rpm、3 分間の遠心分離を施し、DNA 沈殿物を再び -20℃エタノールで洗浄した後、再度、0℃、15000rpm、2 分間の遠心分離を施し、上層のエタノールを除いて、沈殿物中に残っているエタノールを完全に蒸発させた。ここで、得られた DNA に、5 μ l の緩衝液を加えて DNA を溶解し、10 倍濃度の T4 DNA ポリメラーゼ緩衝液 (570mM Tris-HCl (pH 8.0)、57 mM MgCl₂、70mM β -メルカプトエタノール)

u/ μ l の T4 DNA ポリメラーゼを 0.5 μ l 加え、37℃で 15 分間、反応させた。更に、200 μ l の 50mM Tris-HCl (pH 8.0) - 10mM EDTA - 1M NaCl を加えた後、フェノールを加えて酵素を失活させた。次いで、前述の冷エタノール沈殿法より DNA を回収した。

ここで、得られた DNA に 2.0 μ l の緩衝液を加えて溶解させ、 λ リンカー [4 (pCCTCGAAG) / 空質 (塩) 質、0.01-0.05 μ l] を 1 μ l 加え、3 μ l の 10mM ATP、3 μ l の 100mM グチオスレイトール、3 μ l の 500mM Tris-HCl (pH 7.0) - 50mM MgCl₂ を加え、更に、3 u/ μ l の T4 DNA リガーゼを 1 μ l 加えた。15℃で 3 時間の反応を行わせた後、120 μ l の緩衝液を加え全量を 150 μ l とした。

(2) 大腸菌の形質転換

前記 (1) 記載の処理で得られたプラスミド DNA 150 μ l (約 0.5 μ g) に、150 μ l の大腸菌

(*E. coli* K12 C800 株, Jpn. J. Genet., 22 5-245 (1986) 参照) のコンピテント細胞を加え、0℃で、10 分間放置した後、0.7ml の L-ブロスを加えて、37℃、1 時間培養した。次いで、この培養液を L-ブロスに 1.5 倍の希釈と 20 μ g/ml のテトラサイクリンを加えて成る希釈培養の装置に播布して、37℃で一晩培養した。この希釈培養地上にコロニーを形成した 12 株の形質転換体について、個有プラスミドの大きさを調べた。

(3) プラスミドの抽出と分子量の測定及び λ

1. λ 形質転換体の抽出

pTZ199-TPLR の λ 形質転換体は、テトラサイクリン感受性因子 Tc^r中に位置していることから、前記 (1) 記載の処理で λ 形質転換体を増殖すると、テトラサイクリン感受性になることから、テトラサイクリンを加えた L-ブロス希釈培養地上では、形質転換体の生育は見られない。そこで、 λ 形質転換体が感染していてテトラサイクリン耐性を示す形質転換体からプラスミドを抽出し、新たに λ 形質転換体が形成されたプラスミドを

選別した。

すなわち、前記 (2) 記載の処理で得られた形質転換体を 5ml の L-ブロスで一晩培養後、遠心分離処理により濃縮し、2ml の 20mM Tris - 10mM EDTA (pH 8.0) に懸濁し、0.2ml の 0.2g/ml リゾチーム - 0.05g/ml S100 を加えて室温で 5 分間の反応を行った後、0.2ml の 0.2% SDS 溶液を加え室温で 2 分間反応させ、0℃で、10 分間放置後、この溶液に 20,000rpm、0℃で、10 分間の遠心分離処理を施した。分離された上層に緩衝液で溶和したフェノールを等量加え、よく攪とうした。更に、これを 15,000rpm、室温、3 分間の遠心分離処理を施し、DNA を含む水層を採取し、15 μ l ずつ 0.5% アガロースゲル電気泳動にかけて、その分子量を測定した。その結果、12 株の形質転換体の個有するプラスミドは、全ての 3.6kb であった。

次に、この 12 株の形質転換体の個有するプラスミドのうち、目的どおり λ 形質転換体が形成されたものをさがすために、試験に使用された菌りの、DNA を含む水層から冷エタノール法により DNA

16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

・そして、これを pHT300.2PLE と命名した。

続いて、この採取されたプラスミドDNA 10 μ l に2倍濃度の緩衝液 (20m Tris-HCl (pH7.8), 10m MgCl_2 , 10m β -メルカプトエタノール, 100m NaCl) を10 μ l 加え、そこに0.5 μ g / μ l の EcoR I と12 μ g / μ l の EcoRV I を、各々1 μ l 単独又は混合液加し、これを37 $^{\circ}$ 、60分間反応された後、70 $^{\circ}$ 、5分間の加熱処理により、この反応を停止させ、全量を0.8 %アガロースゲルで電気泳動させた。その結果、目的どおり、 EcoR I 切斷

pHT300.7PLE の EcoRI 阻切部位は、全部で 6 個あるが、pHT300.2PLE の DNA を EcoRI で阻切して得られた DNA 断片に関しては、その個数及び各々の分子量をアガロースゲル電気泳動により測定した結果、7 個の断片が確認された。このことは、新たに形成された EcoRI 1 阻切部位に EcoRI 阻切部位が形成されていることを意味するものである。すなわち、pHT300.2PLE は、pHT300.7PLE の EcoRI 1 部位に 2 個の EcoRI 1 リンカーが挿入されたものであり、その結果、新たに EcoRI 阻切部位が形成

1742F の 11 面切片及び A ファージ DNA の 11 面切片の 11 のアオロースゲル (1%) 電気泳動による泳動バンドを参照してみると、 ϕ 1742F 分子量マーカーは、低分子量領域で泳れているものの、アオロースゲル (1%) 電気泳動では、バンド ϕ 、 ψ 、 ξ 、 η 等が検定しているので、その分別が不明確な 5 つの領域であり (第 4 図 A、レーン 1、 $\phi \sim \eta$)、また、A ファージ DNA 分子量マーカーは、高分子量領域にて数定的に有特徴のものである (第 4 図 A、レーン 3) ことから、本実験の分子量マーカーは、その分散分布領域の広さという点で優れたものであることが明らかである。

更に、本発明の分子量マーカーの作製材料であるpHT300PLX及びpHT300.2PLXは、大腸菌（Es. coli H12 C600 株）を宿主として大量生産が容易であることから、生産コストの面でも極めて優れた効果を実現することが確認された。

4. 四角の簡単な証明

第1圖は、プラスミドpHY300PLEの制限酵素地図

-407-

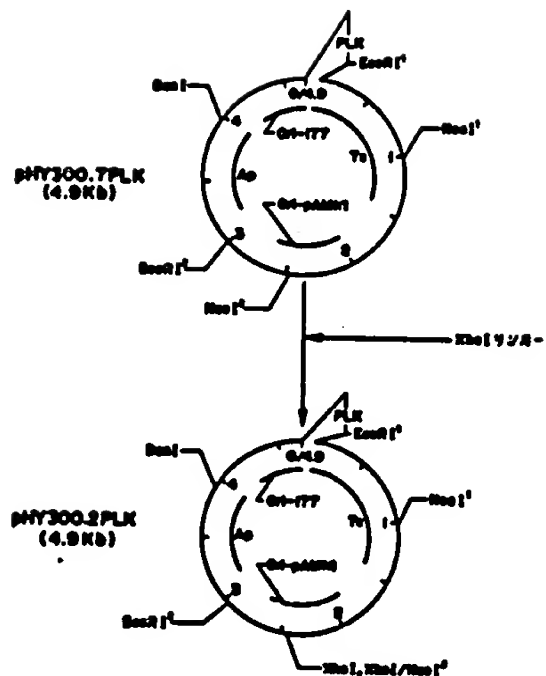
を調べる。

第3図は、プラスミドpHY300.2PLK 制限酵素
地図を調べる。

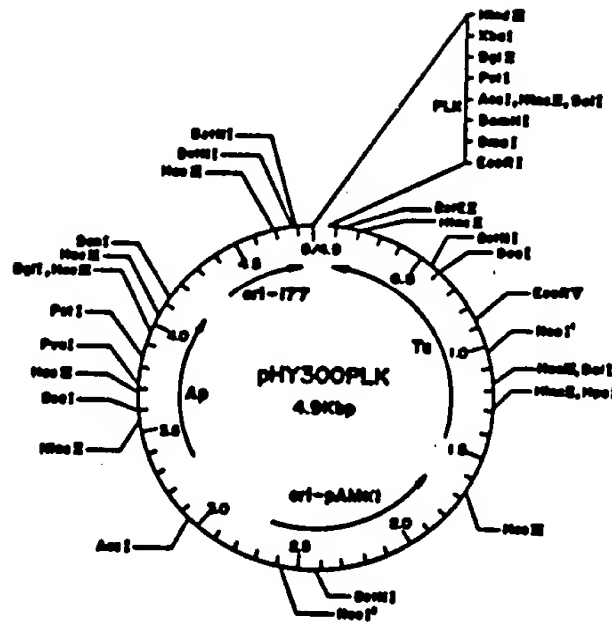
第4図は、アガロースゲル(1%)電気泳動に
よる制限結果として バンドを示す写真であり、
両図のAにおいて、レーン1は、φX 174RF の L₁
制限断片(α~β)を、レーン2は、本発明の分子
量マーカー(A~I)を、レーン3は、Aファ
ージBFA の L₁4 制限断片を、そして、両図Bに
おいて、レーン1は、pHY300.2PLK の L₁2 制限断片を、
レーン2は、pHY300PLK の L₁2 制限断片を、
レーン3は、pHY300PLK の L₁4 制限断片を、
を調べる。

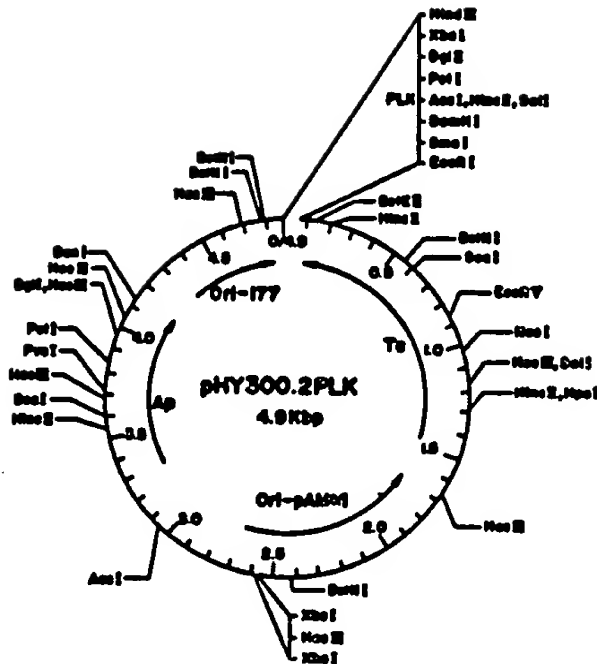
特許出願人 株式会社 ヤクルト本社

代理人 弁護士 尾崎光三



第1図





図面の添付(内容に変更なし)

第 4 図

手続補正書(方式)

昭和61年9月4日

特許庁長官 尾 田 明 雄 閣

1. 事件の表示

特願昭61-148891号



2. 発明の名称

DNAの分子量測定用標準マーカー

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

位 所 東京都港区東新橋1丁目1番19号

(880) 株式会社 ヤクルト本社

名 称 取締役社長 松 岡 昌 巳

4. 代 理 人

位 所 東京都港区東新橋1丁目20番2号

オリエンタル通文館801

氏 名 弁護士 (9119) 尾 崎 元 三



5. 補正命令の日付

昭和61年8月8日
(昭和61年8月28日付発送)

6. 補正により増加する発明の数

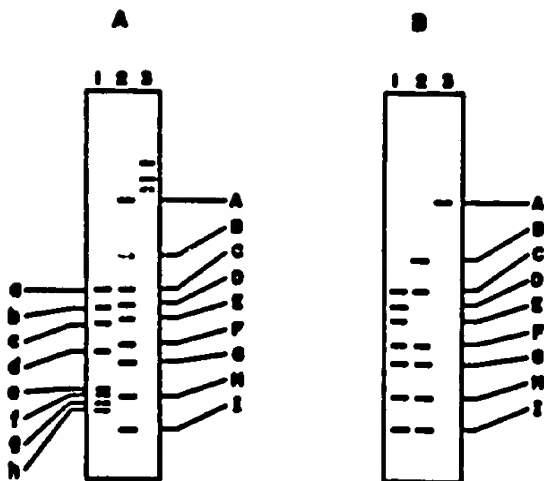
0

7. 補正の対象

明細書の「図面の簡単な説明」の欄

8. 補正の内容

列風の通り



「よる放電結果として 一写真であり、」を
「よる放電結果としてのバンドを写す電子顕微鏡
写真であり、」に修正する。

特許庁長官 小 川 邦 久 閣

1. 事件の表示
昭和61年 特許願 第148891号

2. 発明の名称
DNAの分子量測定用標準マーカー

3. 修正をする者
事件との関係 許出願人
居 所 東京都港区東新橋1丁目1番19号
(00) 株式会社 ヤマト本社
名 称 取締役社長 松 岡 尚 己

4. 代 理 人
住 所 東京都港区東新橋1丁目20番2号
オリエンタル通文館80
氏 名 弁護士 (010) 尾 崎 元 三

5. 修正命令の日付 昭和62年10月7日
(昭和62年10月27日付発達)
6. 修正により増加する発明の数 0

7. 修正の対象 明細書の「図面の簡単な説明」の欄
及び図面(第4図)
8. 修正の内容 列紙の通り



8. 修正の内容

(1) 明細書の「図面の簡単な説明」の欄の記載
を以下のように修正する。

(1) 第18頁第6行～同第7行

「第4図は一写真であり、」を
「第4図は、アダロースゲル(1%)電気放電
による放電結果としてのバンドを顕微鏡で撮影した図
明図であり、」に修正する。

0459